

Japan se Abstract 4-502408

by: Brian Fish

**TITLE: CHIMERIC IMMUNOGLOBULINS SPECIFIC FOR p55 TAC PROTEIN  
OF THE IL-2 RECEPTOR**

**ABSTRACT:**

The present invention provides novel compositions useful, for example, in the treatment of T-cell mediated human disorders, the compositions containing human-like immunoglobulins specifically capable of blocking the binding of human IL-2 to its receptor and/or capable of binding to the p55 Tac protein on human IL-2 receptors. The immunoglobulins can have two pairs of light chain/heavy chain complexes, typically at least one pair having chains comprising mouse complementarity determining regions functionally joined to human framework region segments. For example, mouse complementarity determining regions, with or without additional naturally-associated mouse amino acid residues, can be used to produce human-like antibodies capable of binding to the human IL-2 receptor at affinity levels stronger than about  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

The immunoglobulins, including binding fragments and other derivatives, of the present invention may be produced by a variety of recombinant DNA techniques, with ultimate expression in transfected cells, preferably immortalized eukaryotic cells, such as myeloma or hybridoma cells. Polynucleotides comprising a first sequence coding for human-like immunoglobulin framework regions and a second sequence set coding for the desired immunoglobulin complementarity determining regions can be produced synthetically or by combining appropriate cDNA and genomic DNA segments.

The human-like immunoglobulins may be utilized alone in substantially pure form, or complexed with a cytotoxic agent, such as a radionuclide, a ribosomal inhibiting protein or a cytotoxic agent active at cell surfaces. All of these compounds will be particularly useful in treating T-cell mediated disorders. The human-like immunoglobulins or their complexes can be prepared in a pharmaceutically accepted dosage form, which is dependent on the mode of administration.

The present invention also provides novel methods for designing human-like immunoglobulin chains having one or more complementarity determining regions (CDR's) from a donor immunoglobulin and a framework region from a human immunoglobulin, the preferred methods comprising first comparing the framework or variable region amino acid sequence of the donor immunoglobulin to corresponding sequences in a collection of human immunoglobulin chains, and selecting as the human immunoglobulin one of the more homologous sequences from the collection. The human immunoglobulin, or acceptor immunoglobulin, sequence is typically selected from a collection of at least 10 to 20 immunoglobulin chain sequences, and usually will have the highest homology to the donor immunoglobulin sequence of any sequence in the collection. The human immunoglobulin framework sequence will typically have about 65 to 70% homology or more to the donor immunoglobulin framework sequences. The donor immunoglobulin may be either a heavy chain or light

chain (or both), and the human collection will contain the same kind of chain. A humanized light and heavy chain can be used to form a complete humanized immunoglobulin or antibody, having two light/heavy chain pairs, with or without partial or full-length human constant regions and other proteins.

In another embodiment of the present invention, either in conjunction with the above comparison step or separately, additional amino acids in an acceptor immunoglobulin chain may be replaced with amino acids from the CDR-donor immunoglobulin chain. More specifically, further optional substitutions of a human framework amino acid of the acceptor immunoglobulin relying on a framework amino acid from a donor immunoglobulin will be made at positions in the immunoglobulins where:

- (a) said amino acid in the human framework region of an acceptor immunoglobulin is rare for that position and the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is common for that position in human immunoglobulin sequences; or
- (b) said amino acid is immediately adjacent to one of the CDR's; or
- (c) said amino acid is predicted to be within about 3Å of the CDR's in a three-dimensional immunoglobulin model and capable of interacting with the antigen or with the CDRs of the humanized immunoglobulin.

The humanized immunoglobulin chain will typically comprise at least about 3 amino acids from the donor immunoglobulin in addition to the CDR's, usually at least one of which is immediately adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin. The heavy and light chains may each be designed by using any one or all three of the position criteria.

When combined into an intact antibody, the humanized light and heavy chains of the present invention will be substantially non-immunogenic in humans and retain substantially the same affinity as the donor immunoglobulin to the antigen (such as a protein or other compound containing an epitope). These affinity levels can vary from about  $10^8$  M<sup>-1</sup> or higher, and may be within about 4 fold of the donor immunoglobulin's original affinity to the antigen.

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 公表特許公報 (A)

⑩ 特許出願公報

平4-502408

⑨ Int. Cl. 4

C 12 P 21/08

識別記号

庁内整理番号

8214-4B

8717-4B

7236-4B

審査請求 未請求

予備審査請求 有

C 12 N

15/00

5/00

⑨ 公表 平成4年(1992)5月7日

部門 (区分) 1 (1)

A  
B※

(全 16 頁)

⑨ 発明の名称

IL-2レセプターのp55 Tacタンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン

⑨ 特 願 平2-503677

⑨ 出 願 平1(1989)12月28日

⑨ 優先権主張 ⑨ 1988年12月28日 ⑨ 米国 (U S) ⑨ 290,975

⑨ 発 明 者

クイン、カー、エル。

⑨ 出 願 人

プロテイン デザイン ラブ

ス、インコーポレイテッド

⑨ 代 理 人

弁理士 青木 朗 外3名

⑨ 指 定 国

AT, AT (広域特許), AU, BB, BE (広域特許), BF (広域特許), BG, BJ (広域特許), BR, CF (広域特許), CC (広域特許), CH, CH (広域特許), CM (広域特許), DE, DE (広域特許), DK, ES (広域特許), FI, FR (広域特許), GA (広域特許), GB, GB (広域特許), HU, IT (広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU (広域特許), MC, MC, ML (広域特許), MR (広域特許), MW, NL, NL (広域特許), N

最終頁に続く

アメリカ合衆国、カリフォルニア 94304, パロ アルト, オーク  
クリーク ドライブ 1300  
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94304, パロ アルト, ボータ  
ー ドライブ 3181

⑨ 優先文提出日 平3(1991)5月16日

⑨ 国際出願 PCT/US89/05857

⑨ 国際公開番号 WO90/07861

⑨ 国際公開日 平2(1990)7月26日

請求の範囲

1. p55 Tacタンパク質と特異的に反応する実質的に純粋なヒト免疫グロブリンを含んで成る組成物。
2. 前記免疫グロブリンが2対の軽鎖/重鎖二重体を含んで成り、各鎖が可変領域と定常領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
3. ヒトインターロイキン-2 (IL-2) レセプターへのヒトIL-2の結合を阻害することができる実質的に純粋なヒト免疫グロブリンを含んで成る組成物。
4. 前記免疫グロブリンが約  $10^6 M^{-1}$  またはそれより強いヒトインターロイキン-2 (IL-2) への結合親和性を示す、請求項1に記載の組成物。
5. 前記免疫グロブリンが1つの免疫グロブリンからの相補性決定領域および少なくとも1つの異なる免疫グロブリンからのフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
6. ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域および天然には該フレームワークと関連がない1または複数の外側の相補性決定領域を含んで成る組成物であって、前記免疫グロブリンがヒトインターロイキン-2 レセプターに結合することができる組成物。
7. 前記免疫グロブリンがIgG免疫グロブリンイソタイプである、請求項5に記載の組成物。
8. 成熟軽鎖および重鎖可変領域タンパク質配列が図3および図4中の成熟タンパク質配列と実質的に相同である、請求項6に記載の組成物。
9. 2対の軽鎖/重鎖二重体を有し且つ少なくとも約  $10^6 M^{-1}$  の親和力でヒトインターロイキン-2 レセプター上のエプターと特異的に反応することができるヒト免疫グロブリンであって、前記軽鎖および重鎖が相補性決定領域 (CDR) とヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域とを有する免疫グロブリンからのものである、ヒト免疫グロブリン。
10. ヒトインターロイキン-2 (IL-2) レセプターへのインターロイキン-2 (IL-2) の結合を阻害することができる、請求項9に記載の免疫グロブリン。
11. ヒトインターロイキン-2 レセプターに結合することができるヒト免疫グロブリンであって、前記免疫グロブリンはヒト免疫グロブリン中に抗-Tac 抗体からの1または複数の相補性決定領域 (CDR) を含んで成り、ここで前記ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域は抗-Tac 抗体から選択された少なくとも1つのアミノ酸を含んで成る、ヒト免疫グロブリン。
12. 図3に示されるような成熟軽鎖配列、および図4に示されるような成熟重鎖配列を有する、請求項11に記載のヒト免疫グロブリン。
13. 抗-Tac 抗体からの追加のアミノ酸がCDRのすぐ近くに存在する、請求項11に記載のヒト免疫グロブリン。
14. ヒト患者においてT細胞介在性障害を処置する方法であって、前記患者に治療有効量の請求項1に記載の免疫グ

ロブリンを合成することを含んで成る方法。

15. ヒト受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域をコードする第一の配列および/または複数のマウス免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、発現時に p55 Tac タンパク質と特異的に反応し且つヒト T 細胞上のインターロイキン-2 レセプター (IL-2) への IL-2 の結合を阻止することができる免疫グロブリンをコードする前記ポリヌクレオチド分子。

17. 請求項16のポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた細胞系。

18. 供与体 Ig からの 1 または複数の相補性決定領域およびヒト Ig からのフレームワーク領域を有するヒト化免疫グロブリンの設計方法であって、供与体 Ig 軽鎖または重鎖のフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト Ig 鎖のコレクション中の対応する配列と比較し、そしてヒト Ig 軽鎖または重鎖のフレームワークを提供するためにコレクションからの約3つの最も相溶性の配列のうちの1つを選択することを含んで成る方法。

19. ヒト受容体免疫グロブリンからのフレームワーク領域および抗原に結合することができる供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR) を有するヒト化免疫グロブリンの設計方法であって、下記のような免疫グロブリン中の位置において、受容体免疫グロブリンの少なくとも1つのヒトフ

レームワークアミノ酸を供与体免疫グロブリンからの対応するアミノ酸で置換する段階を含んで成る方法：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置においてまれであり、そして供与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン配列中の前記位置において希有である；または

(b) 該アミノ酸が CDR の1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいて CDR の約3 Å 以内に側鎖原子を有しそして抗原とまたはヒト化免疫グロブリンの CDR と相互作用することができると予想される。

20. 前記ヒト化免疫グロブリン鎖が、CDR に加えて、断片 (a)、(b) または (c) により選択された供与体免疫グロブリンからの少なくとも3アミノ酸を含んで成る、請求項19に記載の方法。

21. 供与体から置換されたアミノ酸のうちの少なくとも1つが CDR のすぐ近くである、請求項20に記載の方法。

22. 請求項18、19または20に従って設計されたヒト化免疫グロブリン。

## 明 細 書

IL-2 レセプターの p55 Tac タンパク質に  
特異的なモノ免疫グロブリン

### 発明の分野

本発明は一般に、新薬治療を開発するための遺伝子 DNA 技術とモノクローナル抗体技術の組合せに関し、更に詳しくは、非免疫性抗体の製造およびそれらの利用に関する。

### 発明の背景

哺乳類では、外来物質、即ち抗原、と特異的に相互作用する2つのタイプの細胞によって免疫応答が媒介される。それらの細胞タイプの1つであるB細胞は、抗体の生産を担う。第二の細胞クラスであるT細胞は、B細胞とT細胞を含む広範な他の造血細胞の両者の生体内機能を調節する様々な細胞サブセットを包含する。

T細胞がこの調節に力を及ぼす1つの方法は、最初はT細胞増殖因子と命名されたインターロイキン-2 (IL-2) として知られるリンホカインの生産を通してである。IL-2 の主な機能はT細胞の刺激と維持であると思われる。実際、ある免疫学者はIL-2 が全免疫応答の中心にあるだろうと考えている (Farrar, J. 他, *Immunol. Rev.* 63: 129-166 (1982) 参照。これに参考として本明細書に組み込まれる)。

その生物学的作用を及ぼすために、IL-2 は特異的な高

親和性レセプターと相互作用する [Greene, W. 他, *Progress in Hematology* 117, E. Braun編, Grune and Stratton, New York (1985), 283-頁]。ヒトIL-2 レセプターは複雑な多量体のタンパク質であり、1本の鎖は Tac ペプチドとして知られる約55kD のサイズである [Leonard, W. 他, *J. Biol. Chem.* 260: 1872 (1985) 参照。これは参考として本明細書中に組み込まれる]。このタンパク質をコードする遺伝子が単離されており、そして21アミノ酸のシグナルペプチドを含む 2727 アミノ酸のペプチドを指定している [Leonard, W. 他, *Nature* 311: 626 (1984) 参照]。p55 Tac タンパク質のN-末端の 219 アミノ酸は明らかに細胞外領域を含んで成る [Leonard, W. 他, *Science* 230: 633-639 (1984) 参照。これは参考として本明細書に組み込まれる]。

ヒトIL-2 レセプターの構造と機能の解明のほとんどは、特異的反応性モノクローナル抗体の開発のためである。特に、抗-Tac として知られるマウスモノクローナル抗体 [Uchiyama 他, *J. Immunol.* 126: 1393 (1981)] は、IL-2 レセプターがT細胞上だけでなく、単球-マクロファージ群、肝臓のクッパー細胞、皮膚のランゲルハンス細胞およびもちろん活性化されたT細胞上でも検出され得ることを示した。重要なことには、静止T細胞、B細胞または循環しているマクロファージは、典型的にはIL-2 レセプターを提示しない [Herrmann 他, *J. Exp. Med.* 162: 1111 (1985)]。

抗-Tac モノクローナル抗体は、IL-2 相互作用を必要とするリンパ球機能を明らかにするために用いられており、

考として本明細書中に組み込まれる。]

不運にも、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体の使用は、特に下記に説明されるような繰り返し治療法において、いくつかの欠点を有する。例えば、マウスモノクローナル抗体はヒト抗体を十分に結合せず、そしてヒトにおいて使用すると他の重要な免疫グロブリン機能特性を欠く。

おそらくより重要なのは、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体が、ヒト患者に注入すると免疫原性となるであろう実質的良さのアミノ酸配列を含むことである。外来抗体の注入後、抗体に対して患者により惹起された免疫応答が非常に強力であり、最初の処置後の抗体の治療効果を本質的に排除しうることを多数の研究が示している。更に、様々な病気を処置するために増加する数の異なるマウスまたは他の抗原性（ヒトに対して）モノクローナル抗体が開発されることとが期待されるので、任意の異なる非ヒトモノクローナル抗体での第一または第二の処置後、無関係の治療のためでもその後の処置が無効または危険になり得る。

いわゆる「キメラ抗体」（例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス可変領域）は幾らか好結果であることが判明したが、重要な免疫原性の問題が残っている。一般に、多数のヒト抗原と同じく、ヒトIL-2レセプターと反応するヒト免疫グロブリンの生産は、典型的なヒトモノクローナル抗体生産技術を使うことは非常に困難である。同様に、いわゆる「ヒト化された」抗体（例えばEPO公報No.0239400を参照のこと）を作製するために超微細DNA技術を使用すること

そして細胞培養における細胞毒性およびナブレッサー-Tリンパ球の発生を含む様々なT細胞機能を抑制することが示されている。また、抗-Tac および他の抗体を用いた研究に基づき、様々な障害、特に成人T細胞白血病がT細胞による不適当なIL-2レセプター発現に関連づけられている。

より最近になって、IL-2レセプターはT細胞媒介性疾患に対する新規治療アプローチの理想的な標的であることが示された。IL-2レセプター特異的抗体、例えば抗-Tacモノクローナル抗体を単独または免疫複合体（例えばリシンA鎖、同位体等との免疫複合体）として用いて、IL-2レセプターを有する細胞を効果的に除去できることが提唱されている。例えばそれらの薬剤は、理論上はIL-2レセプターを発現している白血病細胞、或る種のB細胞、または病状に関与する活性化されたT細胞を排除することができ、その上さらに必要とされる時には成熟正常T細胞およびその前駆体の保持によって正常T細胞免疫応答を開始する能力を確保する。一般に、他のT細胞特異的薬剤の多くは本質的に全ての周辺のT細胞を破壊し得、このことは薬剤の治療効果を制限する。全体に、IL-2レセプターに特異的な適当なモノクローナル抗体の使用は、自己免疫疾患、器官移植および活性化されたT細胞による任意の望ましくない応答において選択的効用を有することができる。実際、例えば抗-Tac 抗体を使って臨床試験が開始されている（一般に、Waldman, T.ら、*Cancer Res.* 45: 625 (1985)およびWaldman, T., *Science* 232: 727-732 (1986)を参照のこと；これらは特

は、一部は予想不可能な結合親和性のためである不確かな結果を提供する。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、さらに治療製剤および他の用途に適合する形態において容易に且つ経済的に生産される改良形のヒト免疫グロブリン、例えばヒトIL-2レセプターに特異的なもの、に対する要求が存在する。本発明はそれらおよび他の要求を満たす。

#### 発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、IL-2レセプターへのヒトIL-2の結合を特異的に阻止することができ、またはヒトIL-2レセプター上のp55 Tacタンパク質に結合することができるヒト免疫グロブリンを含む。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1対がヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に連結されたマウス相補性決定領域を含んで成る如を有する。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約 $10^6 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてヒトIL-2レセプターに結合することができるヒト抗体を生産することができる。

結合性断片または他の誘導体を包含する免疫グロブリンは、様々な超微細DNA技術により、トランスフェクトされた細胞、好ましくは不活化された真核細胞、例えばイエローマ

またはハイブリドーマ細胞中での最大発現を使って生産することができ、ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列と所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチドは、合成的にまたは適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを結合することによって作製することができる。

ヒト免疫グロブリンは、実質的に純粋な形態で単独に、または細胞毒性物質、例えば放射性核種、リポソーム阻害タンパク質もしくは細胞表面において活性な細胞毒性物質と複合体化して、使用することができる。それらの化合物は全て、特にT細胞により媒介される障害を処置することにおいて有用であろう。ヒト免疫グロブリンまたはそれらの複合体は、投与の形式に依存するであろう適当な許容される剤形において調製することができる。

本発明は、供与体免疫グロブリンからの1または複数の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域を有するヒト免疫グロブリン鎖を設計するための新規方法も提供する。好ましい方法は、供与体免疫グロブリンのフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト免疫グロブリン鎖のコレクション中の対応する配列と比較し、そして該コレクションからより相同性の高い配列の1つをヒト免疫グロブリンとして選択することを含んで成る。ヒト免疫グロブリンまたは受容体免疫グロブリン配列は、典型的には少なくとも10-20の免疫グロブリン鎖配列のコレクションから選択され、そして通常は該コレクション中のいずれ

かの配列の供与体免疫グロブリン配列に最も高い相関性を有するだろう。ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列は、供与体免疫グロブリンフレームワーク配列に対して典型的には約65~70%またはそれ以上の相関性を有するだろう。供与体免疫グロブリンは重鎖または軽鎖（または両方）のいずれであってもよく、そしてヒトコレクションは同じ種類の鎖を含むだろう。ヒト化された軽鎖または重鎖を用いて、部分または全長のヒト定常領域および別のナンバリングを含むかまたは含まない、2対の軽鎖/重鎖を有する完全なヒト化免疫グロブリンまたは抗体を形成せしめることができる。

本発明の別の態様によれば、上記の比較段階と共にまたは別々に、受容体免疫グロブリン中の追加のアミノ酸をCDR-供与体免疫グロブリン鎖からのアミノ酸と置き換えることができる。更に特定的には、供与体免疫グロブリンからのフレームワークアミノ酸による受容体免疫グロブリンのヒトフレームワークアミノ酸の異なる位置の置換は、次のような免疫グロブリン中の位置において行うことができる：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の既定アミノ酸がその位置に属しており、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に普通である；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内にあり、そしてヒト化免疫グロブリンの

CDRまたは抗原と相互作用することができると予想される。

ヒト化免疫グロブリン鎖は、典型的には、CDRに加えて、供与体免疫グロブリン鎖からの少なくとも約3アミノ酸を含んでおり、通常は少なくともその1つが供与体免疫グロブリン中のCDRのすぐ近くであろう。3つの位置基準のうちのいずれか1つまたは全部を使うことにより重鎖および軽鎖を各々設計することができる。

完全な抗体に融合される時、本発明のヒト化された軽鎖および重鎖はヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして供与体免疫グロブリンと実質的に同じ抗原（例えばエヒトープを含むナンバリングまたは他の化合物）への親和力を保持しているだろう。それらの親和力レベルは約  $10^6 M^{-1}$  以上から様々に異なることができ、そして抗原への供与体免疫グロブリンのものと親和力の約4倍以内であろう。

#### 図面の簡単な説明

図1：抗-Tac 重鎖（上行）およびEu 軽鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は\*で示されている。

図2：抗-Tac 軽鎖（上行）およびEu 重鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の

最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は\*で示されている。

図3：ヒト化抗-Tac 重鎖可変領域遺伝子のヌクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのヌクレオチドTCTAGAはIbaI 部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸#20のQで始まる。

図4：ヒト化抗-Tac 軽鎖可変領域遺伝子のヌクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのヌクレオチドTCTAGAはIbaI 部位である。成熟軽鎖配列はアミノ酸#21のDで始まる。

図5：A、ヒト化抗-Tac 重鎖遺伝子を合成するのに用いた、5' から3' 方向に記載した4つのオリゴヌクレオチドの配列。B、前記オリゴヌクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴヌクレオチドの3' 方向を指している。

図6：(A) ヒト化抗-Tac 軽鎖遺伝子を合成するのに用いた、5' から3' 方向に記載した4つのオリゴヌクレオチドの配列。(B) 前記オリゴヌクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴヌクレオチドの3' 方向を指している。JF02とJF03とのオーバーラップ中のbind III 部位の位置が示されている。

図7：ヒト化抗-Tac 重鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHuTACの略図。関係する制限部位が示されており、そして重鎖のコード領域が箱として表示されている。免疫グロブリン(Ig) プロモーターからの転写方向が矢印により示されている。E、= 重鎖エンハンサー、Hyg=ヒゲロマイシン耐性遺伝子。

図8：ヒト化抗-Tac 軽鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHuLTACの略図。関係する制限部位が示されており、そして軽鎖のコード領域が箱として表示されている。Ig プロモーターからの転写方向が矢印により示されている。

図9：抗-Tac 抗体またはヒト化抗-Tac 抗体に次いで複合としてフルオレセイン結合ヤギ抗マウスIg 抗体またはヤギ抗ヒトIg 抗体でそれぞれ染色された Hu1-102 および Jurkat細胞のフルオロサイトメトリー。各パネルにおいて、点線曲線は第一抗体が削除された時の結果を示し、実線曲線は記号された第一および第二（複合）抗体を含む時の結果を示す。

図10：(A) 指画されるような0~40ngの抗-Tac、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニリン結合アビジンで染色された Hu1-102 細胞のフルオロサイトメトリー。

(B) 指画の抗体、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニリン結合アビジンで染色された Hu1-102 細胞のフルオロサイトメトリー。

## 発明の詳細な説明

本発明の一態様によれば、所望のエピトープ、例えばヒトT細胞上の1-2レセプター上のエピトープ、と特異的に反応するヒト種免疫グロブリンが提供される。それらの免疫グロブリンは、少なくとも約 $10^4 M^{-1}$ 、好ましくは $10^5 M^{-1}$ ～ $10^6 M^{-1}$ またはそれ以上の結合親和力を有し、例えばヒト1-2レセプターへの1-2の結合を阻止することができる。ヒト種免疫グロブリンは、ヒト種フレームワークを有し、そしてp55 Tacタンパク質上のエピトープと特異的に反応する免疫グロブリン、典型的にはマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有することができる。本発明の免疫グロブリンは、経済的に大量に生産することができ、例えば、種々の技術によるヒト患者におけるT細胞介在性疾患の処置において、用途を見出す。

基本的な抗体構造単位は4鎖体を含むことが知られている。各4鎖体は全く同じ2対のポリペプチド鎖から成り、各対は1本の「軽」(約25kD)鎖と1本の「重」(約50-70kD)鎖を有する。各鎖のNH<sub>2</sub>-末端は、主に抗原認識を担う約100-110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域で始まる。各鎖のCOOH-末端は、主にエフェクター機能を担う定常領域を限定する。

軽鎖は $\kappa$ または $\lambda$ のいずれかとして分類される。重鎖は $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ または $\epsilon$ として分類(および細分類)され、そしてそれぞれIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとして抗体のイソタイプを規定する。軽鎖および重鎖中の可変および定常領域

は、約12またはそれより多数のアミノ酸の「J」領域により連結され、重鎖は約12またはそれより多数のアミノ酸の「D」領域も含む(一般に、*Fundamental Immunology*, Paul, W. M., 第2巻、第131-166頁、Raven Press, N.Y. (1984)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

各軽鎖/重鎖対の可変領域は抗原結合部位を形成する。これは全て、3つの超可変領域によって結合された比較的保存されたフレームワーク領域という同じ一般構造を示す("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. M., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 並びにChothiaおよびLesk, *J. Mol. Biol.*, 198: 901-917 (1987)を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる)。各対の二本鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって整列され、特異的エピトープへの結合を可能にする。

本明細書中で使用する「免疫グロブリン」なる用語は、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされる1または複数のポリペプチドから成るタンパク質について年々更新される免疫グロブリン遺伝子としては、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ および $\mu$ 定常領域遺伝子、並びに多数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。免疫グロブリンは抗体の他に様々な形態で存在することができ、例えば、Fr. Fab およびF(ab)<sub>2</sub>、並びに一本鎖を包含する(例えば、Hestonら、*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883 (1988)およびBirdら、*Science*, 242: 423-426 (1988)。これらは参考として本明

細書中に組み込まれる)。[一般に、Koodら、"Immunology", Benjamin, M. T., 第2版(1984); 並びに HunkapillerおよびKood, *Nature*, 323: 15-16 (1985)を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる。]

キメラ抗体は、典型的には遺伝子操作によって軽鎖および重鎖遺伝子が異なる鎖に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから作製されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変(V)セグメントをヒト定常(C)セグメント、例えば $\gamma$ 、および $\mu$ 、に結合することができる。典型的な製法用キメラ抗体はマウス抗体からのVまたは抗原結合領域とヒト抗体からのCまたはエフェクター領域とから成るハイブリッドタンパク質である(例えば、A. T. C. 登録番号CRL 9688は抗-Tac キメラ抗体を分泌する)が、他の哺乳動物種を使用することもできる。

本明細書中で使用する「フレームワーク領域」なる用語は、Kabatら、前掲により定義されたように、単一鎖において異なる免疫グロブリン間で比較的保存される免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域の部分について呼称する。本明細書中で使用する「ヒト種フレームワーク領域」なる用語は、各々存在する鎖においてヒト免疫グロブリン中のものと等しい少なくとも約70またはそれ以上のアミノ酸残基、典型的には75-85またはそれ以上のアミノ酸残基を含んで成るフレームワーク領域である。

本明細書中で使用する「ヒト種免疫グロブリン」なる用語は、ヒト種フレームワーク領域を含んで成る免疫グロブリン

について言及し、この場合、存在する任意の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に相同であり、即ち少なくとも約85-90%、好ましくは約95%が同一である。よって、おそらくCDRを除くヒト種免疫グロブリンの全ての部分分が、1または複数のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に相同である。例えば、ヒト種免疫グロブリンはマウス可変領域/ヒト定常領域キメラ抗体を包含しないだろう。

本発明の別の一般の観点によれば、ヒト化された免疫グロブリン鎖を含んで成る抗体の親和力を増加させるために、ヒト種またはヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の限定された数のアミノ酸が受容体1よりもむしろ供与体1中のそれらの位置のアミノ酸と同じであるように選択される基準も含まれる。

本発明のこの観点は、(例としてCDRの入手策としてマウス抗体を使つて)ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の2つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく：

(1) マウスCDRをヒトフレームワークと結合する時、CDRに密接したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に結び付けようとせずに、本発明者らは、それらの変更されたアミノ酸が供与体マウス抗体中とは異なる静電的または疎水的力を生じるため、それらがわずかにCDRを歪め、そして歪められたCDRは供与抗体中のCDRが行うのと同じくらい効果的な抗原との接触を行うことができないと考える；

(2) また、CDRに形成しているがその一部ではない(即ちまだフレームワークの一部である)元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の源泉である抗原との接触を行うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

それらの問題を回避するため、および所望の抗原に対し非常に強力な親和力を有するヒト化抗体を生産するために、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するのに次の4つの基準を使用する。それらの基準を単独または必要時は組み合わせ使用し、所望の親和力または他の特徴を獲得することができる。

基準I: 受容体として、ヒト化しようとする供与体免疫グロブリンに非常に相同である特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを使用するか、または多数のヒト抗体からの共通のフレームワークを使用すること。例えば、データバンク(例えばNational Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource)中のヒト免疫(軽鎖)可変領域に対するマウス重鎖(軽鎖)可変領域の配列の比較は、異なるヒト領域に対する相溶性の程度が典型的には約40%から約60-70%まで大幅に異なることを示す。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの重鎖(それぞれ軽鎖)に最も相同であるヒト重鎖(それぞれ軽鎖)の1つを選択することにより、供与体免疫グロブリンから受容体免疫グロブリンに移る際にはほとんどアミノ酸が変化しないであろう。よって、ヒト化免疫グロブリンを含んで成るヒト化抗体の正

確な全形状が供与抗体の形状と非常によく似ており、CDRを認める見込みを減らすことができる。

典型的には、重鎖フレームワークを提供するために、少なくとも約10-20の別個のヒト重鎖の代表的コレクションの中の3-5の最も相同な重鎖可変領域配列のうちの1つが受容体として選択され、軽鎖についても同様にして選択されるだろう。好ましくは、1-3の最も相同な領域のうちの1つが使用されるだろう。選択された受容体免疫グロブリンは、供与体免疫グロブリンに対してフレームワーク領域内が最も好ましくは少なくとも約65%の相同性を有するだろう。

いかにして受容体免疫グロブリンを選択するかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のそれらの位置のアミノ酸と同じになるようにヒト化免疫グロブリンのフレームワーク中の少数のアミノ酸を選択することによって、より高い親和力を獲得することができる。好ましくは、それらの基準の1つを満足するほとんどまたは全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸が実際に選択されるだろう。

基準II: ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない(即ち「まれである」); 本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中のヒト重鎖(それぞれ軽鎖)V領域配列のたった約10%しかその位置に存在しないアミノ酸を示す)場合、またはその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である(即ち「普通である」); 本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中の少なくとも約25%の配列に存在するアミノ酸を示す)場

合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、普通でないアミノ酸をたまたまヒト抗体に典型的である供与体抗体からのアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体を低免疫原性にする事ができる。

基準III: ヒト化免疫グロブリン中の3つのCDRのすぐ近く的位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。それらのアミノ酸は、おそらく特にCDR中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体CDRを破壊しそして親和力を低下させるであろう。更に、近隣のアミノ酸は抗原と直接相互作用し(Amitら、*Science*, 233, 747-753 (1986)、これは参考として本明細書中に組み込まれる)、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を提供する全ての抗原接触を維持するのに望ましいかもしれない。

基準IV: 典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDRの外側の端つかのアミノ酸がCDRに密接しておりそして水素結合、ファンデルワールス力、静電的相互作用等によりCDR中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択される。この基準に従ったアミノ酸は、通常はCDR中の成る部位の約3人単位内に閉鎖原子を有し、そして対立された化学的、例えば上記に列挙した力に従ってCDR原子と相互作用するこ

とができるような原子を含まなければならない。抗体などのタンパク質のモデルを作成するためのコンピュータプログラムが一般に利用可能であり、そして当業者に周知である(Loevら、*Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.*, 15: 55-66 (1988); Bruccoleriら、*Science*, 233: 755-758 (1986))を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる)。それらは本発明の部分を構成しない。実際、全ての抗体が類似の構造を有するので、Brookhaven Protein Data Bankから入手可能である既知の抗体を必要であれば別の抗体のモデルとして利用することができる。商業的に入手可能であるコンピュータプログラムを用いてコンピュータ画面にそれらのモデルを表示し、原子間の距離を算出し、そして様々なアミノ酸相互作用の可能性を評価することができる。

ヒト化またはヒト様抗体は、ヒト産性において使用されるマウス抗体または或る場合にはキメラ抗体を上回る少なくとも3つの相対的利点を有する:

1) エフェクター部分がヒトであるため、ヒト免疫系のその他の部分と良好に反応することができる(例えば、補体依存性細胞障害作用(CDC)または抗体依存性細胞障害作用(ADCC)により、より効果的に癌細胞を破壊する)。

2) ヒト免疫系は外来物としてヒト化抗体のフレームワークまたは定常領域を認識しないであろう。従ってそのような在入抗体に対する抗体応答は全体的に外来のマウス抗体または部分的に外来のキメラ抗体に対するよりも小さいであろう。

3) 在入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも



ずっと短いヒト抗体中の半減期を有することが報告されている (B. Sauer, *J. Immunol.*, **133**: 4534-4538 (1987)). 注入されたヒト抗体は、おそらく天然のヒト抗体により類似した半減期を有し、より少量または少頻度の用量を与えることを可能にするだろう。

本発明は、EPA公報No0239400に記載されたものに関して改訂されたヒト化免疫グロブリン (例えば、ヒトIL-2レセプターに結合することができる) に特に向けられる。その出願明細書 (その開示は本発明の範囲から除去される) は、成る種の免疫グロブリンについて、受容体抗体の軽鎖または重鎖可変領域中のCDR領域を異なる特異性の抗体からのCDRの類似部分 (典型的には宿主の影響を受けやすい部分) で置換することを記載している。また、その出願明細書は、成る種の免疫グロブリンについて、抗原結合部位から (特異的に) 発現されやすい残基を単に移動する可能性を記載しており、この残基は明らかに残つたフレームワーク領域を含むことができる (特に、Amitら、*Science*, **233**: 747-753 (1986)) に記載されたような抗原結合に関与することが既知である残基、またはおそらく間接相互作用に必須である残基 (ただしそれらの選択については出願明細書において不十分な指針しか与えられていない)。例えば、本発明の好ましい態様は、全CDRアミノ酸およびCDRの1つ (または好ましくは各々) のすぐ近くのフレームワークアミノ酸を置換することを伴う。一般に、例えばコンホメーション (および普通はそれらの抗原結合特異性) を維持するためにCDRと連絡をとる

任意のフレームワーク残基が、上記に開示に記載された本発明の好ましい態様の範囲内に特に含まれる。

1つの観点において、本発明は、所望のエピトープ、例えばヒトIL-2レセプター上のエピトープ、に結合することができる免疫グロブリン (例えば抗-Tacモノクローナル抗体) からの重鎖および/または軽鎖CDR (典型的には上述したような別のアミノ酸残基を有する) をコードする短鎖DNAセグメントに向けられる。それらの領域をコードするDNAセグメントは、典型的にはヒトフレームワーク領域をコードするDNAセグメントに結合されるだろう。例えば、発現時に抗-Tac重鎖および軽鎖可変領域 (ヒトフレームワーク領域と共に) を含んで成るポリペプチド鎖をコードする好ましいDNA配列がそれぞれ図3と図4に示されている。コドン最適および重要でないアミノ酸置換のため、変換するようにそれらの配列の代わりに他の配列を容易に用いることができる。

前記DNAセグメントは、典型的には、ヒト抗体のコード配列に作用可能に連結した発現調節DNA配列、例えば天然由来のまたは異種のプロモーター領域、を更に含むだろう。好ましくは発現調節配列は、真核生物宿主細胞を感染後またはトランスフェクションせしめることができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。ベクターが適当な宿主中に組み込まれれば、宿主はスクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、組織、重鎖、軽

鎖/重鎖二量体もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の取得および精製を行うことができる。

ヒト可変領域DNA配列は、周知の方法に従って、個々のヒト細胞から、好ましくは不活化されたB細胞から単離することができる (Kabat、前掲およびNP 87/02571を参照のこと)。例えば、ヒト免疫グロブリン定常およびJ領域遺伝子および配列はHeiterら、*Cell* **22**: 197-207 (1980)中に記載されており、そしてヒト免疫グロブリンC $\gamma$ 、遺伝子のスクレオチド配列はElisonら、*Nucl. Acid Res.*, **10**: 4071 (1982)中に記載されている (その両者は参考として本明細書中に組み込まれる)。本発明の免疫グロブリンを複製するためのCDRは、所望の抗原 (例えばヒトIL-2レセプター) に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして導出され、そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物細胞において生産されるだろう。DNA配列の適当な起源細胞並びに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、多数の入手源、例えばアフリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができる ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.; これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

本明細書中に特定的に記載のヒト免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同の」免疫グロブリンを容易に設計することができ、そして当業者が周知の様々な短鎖DNA

A技術を使って製造することができる。例えば、IL-2レセプター免疫グロブリンについては、フレームワーク領域は残つたアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図3および図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト免疫グロブリンを基として、個々の異なるヒトフレームワーク領域を単独または組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の修飾は周知の技術、例えば部位特異的突然変異誘発 (GilliesおよびSmith, *Gene*, **8**: 81-97 (1979)) 並びに Robertsら、*Nature*, **323**: 731-734 (1987)を参照のこと; この両者は参考として本明細書中に組み込まれる) により容易に達成することができる。あるいは、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片は (または複数の免疫グロブリン活性 (例えば抗体結合活性) を有する。また多数の遺伝子と同様、免疫グロブリン関連遺伝子は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する別々の調節性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの調節性領域 (例えば御寒: 1987年12月15日提出の一般譲渡されたU.S.S.N. 132,387を参照のこと。これは参考として本明細書中に組み込まれる) と融合させ、新規性質を有する融合タンパク質 (例えば免疫阻害) を製造することができる。

最終的に所望のヒト抗体を表現することができる本発明の核酸配列は、様々な異なるポリスクレオチド (ゲノムDNAまたはcDNA、RNA、合成オリゴスクレオチド等) および成分 (例えばV、J、DおよびC領域) から、そして様々な異

なる技術により、形成せしめることができる。通常のゲノム配列を逐次することが現在最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい（ヨーロッパ特許公開No.6229403およびReichman, L. R., *Nature* 332: 323-327 (1987)を参照のこと。この両者は参考として本明細書中に組み込まれる）。

前に述べたように、該DNA配列を発現調節配列に作用可能に連結した（即ち、機能を促進するように配置させた）後、該配列が宿主中で発現されるだろう。これらの発現ベクターは、典型的にはエキソソームとしてまたは宿主染色体DNAの組み込み部分として宿主中で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列により形質転換された細胞の放出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシン耐性遺伝子を含むだろう（例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

大腸菌(*E. coli*)は本発明のDNA配列をクローニングするの特に有用な原核生物宿主である。使用に適当な他の微生物宿主としては、バシラス属、例えばバシラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)、並びに他の細菌類、例えばサルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)および種々のシェドモナス属(*Pseudomonas*)種が挙げられる。これらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性である発現調節配列（例えば複製開始点）を含むであろう発現ベクターを構築することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、ト

リプトファン(*trp*)プロモーター系、ターラタマーゼプロモーター系、またはメファージからのプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして転写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位等を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。マッコロミセス(*Saccharomyces*)は好ましい宿主であり、適当なベクターは、発現調節配列、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼおよび他の解糖酵素プロモーターを含むプロモーター、並びに所望により複製開始点、終結配列等を有する。

微生物に加えて、哺乳動物組織培養細胞を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめることもできる

(Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる)。完全な免疫グロブリンを分泌することができる多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際には異種細胞が好ましい。そのような異種細胞としては、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、HeLa細胞、ニコロマ細胞系等が挙げられるが、好ましくは形質転換されたB細胞またはハイブリドームである。これらの細胞のための発現ベクターは、発現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー [Queen, C. R., *Immunol. Rev.* 89: 49-68 (1985)；これは参考として本明細書中に組み込まれる

る]、および必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアダニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現調節配列は、エンハンサーを有するSV40 (MulliganおよびBerg, *Science* 209: 1422-1427 (1980)を参照のこと)、免疫グロブリン遺伝子、アデノウイルス、ワイルス類ウイルス等に由来するプロモーターである。

宿主のDNAセグメント（例えば、置換および挿入コード配列並びに発現調節配列）を含むベクターは、細胞宿主のタイプに依存して異なる周知の方法により、宿主細胞中に移すことができる。例えば、懸液細胞には塩化カルシウムトランスフェクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される（一般には、Maniatisら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

一度発現されれば、本発明の完全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を当業界の標準法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等に従って精製することができる（一般的には、Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y. (1982)を参照のこと）。少なくとも約90-95%均質の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98-99%またはそれ以上の均質が重要用途に好ましい。部分的にまたは所望の時には均質まで精製

されれば、疫学的に（体外的を含む）またはアッセイ方法、免疫蛍光染色法等を開発しそして実施する際に該ポリペプチドを使用することができる（一般的には、*Immunological Methods*, 第1および2巻、LefkovitchおよびPerin編, Academic Press, New York, N. Y. (1979および1981)を参照のこと）。

本発明において例示されるIL-2レセプター特異抗体は、典型的にはT細胞介在性の病状状態を処置することにおいて個々に用いられるだろう。通常、病状に関連する細胞がIL-2レセプターを有すると同定された場合、ヒトIL-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することができるヒト抗体が適当である（"Treating Human Malignancies and Disorders"と題するU.S.S.N.085,707を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。例えば、処置に適する典型的な病状状態として、器官移植、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓等の移植を行う患者における移植拒絶反応および対宿主性移植片病が挙げられる。他の病状としては、自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡および重症筋無力症が挙げられる。

本発明のヒト抗体は、別の抗体、特に病状の一因となる細胞上の別のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組合せて使用することもできる。例えば、適当なT細胞マーカーとしては、第一回国際白血球分化ワークショップ(First International Leukocyte Differentiation Workshop), *Leukocyte Typing*, Bernardら編, Springer-Verlag, N. Y.

(1984) (これは 考として本明細書中に組み込まれる) により命名されたいわゆる「分化のクラスター (Clusters of Differentiation)」中に分類されるものを認めることができる。

該抗体は、化学療法剤または免疫抑制剤と共に与えられる病々に投与される組成物として使用することができる。典型的には、そのような薬剤としては、シクロスポリンAまたはプリン類 (例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン等) が挙げられるだろうが、当業者に周知である多数の他の薬剤 (例えばシクロホスファミド、ブレドニソン等) も使用することができる。

本発明の好ましい医薬組成物は、免疫系における抗原抗体の使用を含んで成る。免疫系は2つの成分により特徴づけられ、そして試験管内または生体内において選択細胞を殺すのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して過剰に致命的である細胞毒性物質である。「デリバリービタール」として知られる第二成分は、毒性物質を特定の細胞タイプ、例えばガンを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は様々な周知の化学的方法のいずれかによって一様に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は異種二価性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によることができる。種々の免疫系の特長が当業界で周知であり、例えば "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bul-

let", Thorpeら, *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, 154-199 (1982) 中に見つけることができる。これは参考として本明細書中に組み込まれる。

様々な細胞毒性物質が免疫系における使用に相当である。細胞毒性物質としては、放射能核種、例えばヨウ素-131、イットリウム-90、レニウム-188 およびビスマス-212; 多数の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキサート、アドリアマイシンおよびシスプラチン; 並びに細胞毒性タンパク質、例えば、リボソーム阻害タンパク質アムリカマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナス菌毒素A、リシン、ジフテリヤ毒素、リシンA等; または細胞表面で活性な物質、例えばホスホリパーゼ酵素 (例えばホスホリパーゼC) を挙げることができる。[1988年12月28日に提出された一般開示されたU. S. 5, 3, 07/290, 562; "Chimeric Toxins", OlssonおよびPhil, *Pharmac. Ther.*, 25: 355-381 (1982); 並びに "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", BaldwinおよびByers 編, 159-173, 224-266 頁, Academic Press (1985) を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる。]

免疫系のデリバリー成分は、本発明のヒト免疫グロブリンを含むだろう。好ましくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えば Fabが使用される。典型的には、免疫系中の抗体はヒト IgMまたはIgG イソタイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物系領域を用いることもできる。

本発明のヒト抗体およびその医薬組成物は、特に経口、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に有用である。経口投与用組成物は、通常、許容される量、好ましくは水性媒体中に溶解された抗体の溶液または混合物を含んで成るだろう。様々な水性媒体、例えば水、炭酸化された水、0.4% 食塩水、0.3% グリシン等を使用することができる。それらの媒体は無菌であり、通常は粒状物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の滅菌技術により滅菌することができる。該組成物は、適切な生理的条件下に必要である時は医薬上許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含むことができる。それらの組成物中の抗体の濃度は広範囲に渡り異なることができ、即ち、少なくとも約0.5% 未満から、通常は少なくとも約1% から、15-20重量% はどまでと及ぶことができ、そして該媒体の粘度等に主として基づいて、選択された特定の投与形式に従って選択されるだろう。

筋肉内注射用の典型的医薬組成物は、1 ml の無菌滅菌液と50 mg の抗体を含むように調製することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250 ml の無菌リンガー液と150 mg の抗体を含むように調製することができる。経口投与可能な組成物の実際の調製方法は当業者に周知であるかまたは明白であり、そして例えば *Reisinger's Pharmaceutical Science*, 第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記載されており、これは参考として

本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は貯蔵のために凍結乾燥することができる。そして使用前に適切な媒体中で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当業界で周知の凍結乾燥および再構成技術を用いることができる。凍結乾燥と再構成は様々な程度の抗体活性の低下をもたらす可能性がある (例えば従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある)、そして使用レベルを調整して埋め合わせなければならないことがあることは、当業者により明白であろう。

本発明のヒト抗体またはその混合物を含む組成物は、予防および/または治療のために投与することができる。治療用途においては、組成物は、既に病気にかかっている患者に、病気を治療するかまたは少なくとも部分的に緩和するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は「治療的有効量」と定義される。この用途に有効な量は、疾患の重症度および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1-約200 mg の抗体、より好ましくは患者あたり5-25 mg の用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深刻な病状状態、即ち命にかかわるかまたはもしかすると命にかかわる状況において使用されるだろうことを全頭に置かなければならない。そのような場合、本発明のヒト抗体はにより選択される外来性物質の最小化および「外来物質」拒絶の低水準の点からみて、実質的に過剰量の抗体を投与することが可能でありそして治療に

より望ましいと感じられるかもしれない。

予防用途においては、本発明の抗体またはその混合物を含有する組成物は、患者の抗体性を高めるためにまだ病状でない患者に投与される。そのような量は「予防的有効量」として定義される。この用途の場合、正確な量は患者の病状状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1〜25mg、特に患者あたり0.5〜2.5mgであろう。好ましい予防用途は、腎臓移植拒絶の防止である。

本発明のヒト抗体は、更に試験管内において広範な用途を見出すことができる。一例として、T細胞の型決定、特異的IL-2レセプターを有する細胞または抗レセプターの断片の準備、ワクチンの調製等に抗原的な抗体を利用することができる。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト抗体と反応性である別の標識抗体（二次抗体）、例えばヒト免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体と組合せて使用することができる。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、蛍光団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプタン）、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

細胞活性に対する保護もしくは検出または選択された抗原の存在の検出において問題の抗体を使用するためにキットを供給することもできる。本発明の問題の抗体組成物は、単独

でまたは所望の細胞タイプに特異的な追加の抗体と共に、普通は1つの容器に凍結乾燥形態で提供することができる。抗体は乾燥もしくは高濃度と混合されていても未混合であってもよく、緩衝液、例えばTris、リン酸塩、炭酸塩等の緩衝液、安定剤、殺菌剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等、および使用試明書のメットと共にキット中に含まれる。一般にこれらの材料は活性抗体の量を基にして約5重量%未満、通常は抗体濃度を基にして少なくとも約0.001重量%の合計量において存在するだろう。しばしば、活性成分を希釈するための不活性増量剤または緩衝剤を含めることが望ましく、この場合緩衝剤は全組成の約1〜49重量%で存在することができる。キメラ抗体を組合せることができる二次抗体をアッセイにおいて使用することができ、これは通常は別の容器中に存在するだろう。二次抗体は典型的には標識と結合され、上述の抗体製剤と同様に凍結乾燥される。

次の実施例は例示の目的で与えられ、限定のためではない。

## 実 験

### ヒト抗体および重鎖遺伝子の設計

ヒト抗体のフレームワークを提供するためにヒト抗体Euの配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, E.ら, U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983)を使用した。というのは、抗-Iacの重鎖のアミノ酸配列がNational Biomedical Foundation Protein Identification Resource 中の他のいずれの重鎖配列よりもこの抗体

の重鎖に相同性が高かったためである。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Iac 重鎖配列（一般に知られたU.S.S.R.の186,362と223,037を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる）をEu重鎖配列と対照した（図1）。各位置において、その位置が次のカテゴリーのいずれか1つに入らない限り、Euアミノ酸をヒト化配列のために選択した。次のカテゴリーのいずれか1つに入る場合、抗-Iac アミノ酸を選択した。

(1) その位置が、Kabatら、前掲により定義されたような相補性決定領域(CDR) 中にある（アミノ酸31-35, 50-66, 99-105）；

(2) その位置ではEuアミノ酸がヒト重鎖配列にまれであり、一方抗-Iac アミノ酸がその位置でヒト重鎖配列に典型的であった（アミノ酸27, 93, 95, 98, 107-109, 111）；

(3) その位置が抗-Iac 重鎖のアミノ酸配列中のCDRのすぐ近くであった（アミノ酸30と67）；

(4) 抗-Iac 抗体の3次元モデルが、該アミノ酸が抗原結合部位に物理的に密接していることを示唆した（アミノ酸43と68）。

残つたアミノ酸はそれらのカテゴリーのうちの複数に入るが、それらは1つのカテゴリーにのみ当ててある。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Iac 軽鎖配列をEu軽鎖の配列と対照させた（図2）。その位置が同じカテゴリー（1）〜（4）のうちの1つに入らない限り、Euアミノ酸を各位置において選択した（カテゴリー定義中の重

鎖を軽鎖で置き換える）：

(1) CDR（アミノ酸24-34, 50-55, 89-97）。

(2) Euよりも抗-Iac アミノ酸がより典型的である（アミノ酸48と63）。

(3) CDRに近い（アミノ酸なし；Euと抗-Iac はそれらの位置全てにおいて互に同じであった）。

(4) 結合領域に3次元的に近接している可能性（アミノ酸60）。

重鎖（図3）と軽鎖（図4）の実験のスクレオチド配列は次のようにして選択した。

(1) 該スクレオチド配列は上述のようにして選択したアミノ酸配列をコードする。

(2) それらのコード配列の5'側のスクレオチド配列はリーダー（シグナル）配列、即ちMOPC 53抗体の軽鎖のリーダーおよびPCN 108A抗体の重鎖のリーダー（Kabatら、前掲）をコードする。それらのリーダー配列を抗体の典型として選択した。

(3) コード配列の3'側のスクレオチド配列は、抗-Iac 配列の一部分であるマウス重鎖J5セグメントおよびマウス軽鎖J5セグメントに従う配列である。それらの配列はスプライス結合配列を含有するために含まれる。

(4) 配列の各末端には、Iba1部位での切断およびベクターのIba1部位へのクローニングを可能にするためのIba1部位が存在する。

ヒト化抗体および重鎖遺伝子の発現

重鎖を合成するために、Applied Biosystems 380B DNA合成装置を使って4つのオリゴヌクレオチド NES12, NES13, NES14, NES15 (図5A) を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、重鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている (図5B)。各オリゴヌクレオチドは一緒にすると、XbaI 部位での切断を可能にするために各鎖に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化重鎖をカバーする。該オリゴヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

各オリゴヌクレオチドを、標準手順 (Maniatis, 前掲を参照のこと) によりATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼを使ってリン酸化した。リン酸化したオリゴヌクレオチドをアニーリングするために、それらを各々約3.75Mの濃度において40MのT4 (33mM Tris-HCl, pH7.9, 66mM 酢酸カリウム、10mM 酢酸マグネシウム) 中に一緒に懸濁し、4分間95℃に加熱し、そして4℃にゆっくり冷却した。各オリゴヌクレオチドの反対鎖を合成することにより該オリゴヌクレオチドから完全な遺伝子を合成するために (図5B)、次の成分を100μlの最終容積において添加した:

- 10μl アニールしたオリゴヌクレオチド
- 各0.16mM デオキシリボヌクレオチド
- 0.5mM ATP
- 0.5mM DTT

ヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。軽鎖遺伝子はそれらのオリゴヌクレオチドから2部分において合成した。JF01とJF02各々3.5μlを20μlのシークエナーゼ緩衝液 (40mM Tris-HCl, pH7.5, 20mM 酢酸マグネシウム、50mM 塩化ナトリウム) 中に懸濁し、70℃に3分間加熱し、そして該オリゴヌクレオチドをアニーリングさせるためにゆっくりと23℃まで冷却した。JF03とJF04も同様にして処理した。各反応液をDTT 10mMおよび各デオキシヌクレオチド0.5mMにし、6.5uのシークエナーゼ (BS Biochemicals) を最終容積24μlにおいて添加し、そして37℃で1時間インキュベートして該ヌクレオチドの反応方向鎖を合成した。各反応液に XbaI と HindIII を添加してDNAを消化した (JF02とJF03がオーバーラップする領域の中、従って合成されたDNAの各々の中にHindIII部位が存在する; 図6B)。反応液をポリアクリルアミドゲル上で泳動し、XbaI-HindIII断片を精製し、そして標準法により pUC18中にクローニングした。各断片について数個のプラスミド単離物をジデオキシ性により配列決定し、そして正しいものを選択した。

ヒト化抗体および重鎖を発現させるためのプラスミドの作製

重鎖 XbaI断片が挿入されている pUC19プラスミドから該断片を抽出し、そして標準法により正しい方向においてベクターpVet1 (一般に提供されたU.S.S.N. 223,037 を参照のこと) の XbaI 部位に挿入し、プラスミドpJucTAC1 (図7) を作製した。このプラスミドは、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの完全重鎖を発現するだろう。

100μl/ml BSA

3.5μl/ml T4 g43タンパク質 (DNAポリメラーゼ)

25μl/ml T4 g44/62タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

25μl/ml 15タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

この混合物を37℃で30分間インキュベートした。次いで10uのT4 DNAリガーゼを添加し、そして37℃で30分間インキュベートした。70℃で15分間反応液をインキュベートすることにより、ポリメラーゼとリガーゼを不活性化した。遺伝子をXbaIで消化するために、反応液に200μl/mlのBSAと1mMのDTTを含む50μlの2×TAE、43μlの水、および5μl中の50uのXbaIを添加した。反応液を37℃で3時間インキュベートし、そしてゲル上で泳動した。ゲルから431bpのXbaI断片を精製し、そして標準法によりプラスミドpUC19のXbaI部位中にクローニングした。4つのプラスミド単離物を精製し、ジデオキシ性を使って配列決定した。そのうちの1つが正しい配列を有した (図3)。

軽鎖を合成するために、4つのオリゴヌクレオチドJF01, JF02, JF03, JF04 (図6A) を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、軽鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている (図6B)。該オリゴヌクレオチドは一緒にすると、XbaI 部位での切断を可能にするために各鎖に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリ

2つの軽鎖 XbaI-HindIII断片が挿入されている各 pUC18 プラスミドからそれらの断片を単離した。ベクタープラスミドpVet1 (一般に提供されたU.S.S.N. 223,037 を参照のこと) を XbaI で切断し、標準法により脱リン酸しそして2断片を連結せしめた。所望の反応生成物は次のような図状形を有する: ベクター-XbaI断片1-HindIII断片2-XbaI-ベクター。数個のプラスミド単離物を制限マッピングと配列決定により分析し、この形態を有する1つのプラスミドを選択した。このプラスミドpJucTAC1 (図8) は完全なヒト化軽鎖 (図4) を含有し、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの軽鎖を発現するだろう。

ヒト化抗体の合成および親和力

プラスミドpJucTAC1およびpJucTAC2をマウス Sp2/O細胞中にトランスフェクトし、そして該プラスミドを組み込んだ細胞を、プラスミド上の spfおよびbyx 遺伝子 (図7, 8) により付与されるミコフェノール酸および/またはヒグロマイシンBに対する耐性に基づいて標準法により選択した。これらの細胞がIL-2レセプターに結合する抗体を分泌したことを確かめるために、細胞からの上清をIL-2レセプターを発現することが知られている HUT-102 細胞と共にインキュベートした。洗浄後、細胞をフルオレセイン接合ヤドリヒト抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そしてFACSscanサイトフルオロメーター上で蛍光について分析した。結果 (図9A) は、ヒト化抗体がこれらの細胞には結合するが、IL-2レセプターを発現しないJurkat T細胞には結合しない

い(図9D)ことを明らかに示す。対照として、もとのマウス抗-Tac抗体を用いてそれらの細胞を染色すると同様な結果を与えた(図9B、C)。

更なる実験のために、ヒト化抗体を生産する細胞をマウスに注入し、そして生じた腹水を回収した。腹水法に従って Affigel-10支持体(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA)上に固定されたナギバヒト免疫グロブリン抗体のアフィニティカラムに通過させることにより、腹水からヒト化抗体を実質上均質まで精製した。もとの抗-Tac抗体と比較してヒト化抗体の親和力を測定するために、結合的結合実験を行った。約  $5 \times 10^4$  倍の HUT-102 細胞を既知量(10-40ng)の抗-Tac抗体とヒト化抗-Tac抗体と共に4℃で10分間インキュベートした。次いで細胞に100ngのビオチン化抗-Tacを添加し、そして4℃で30分間インキュベートした。この量の抗-Tacは細胞上の結合部位を飽和するのに十分であり、大過剰であってはならないことが予め決定されている。0.1%アジ化ナトリウムを含む2mlのリン酸緩衝化塩溶液(PBS)で細胞を2回洗浄した。次いで250ngのフィコエリトリン結合アビジンと共に細胞を4℃で30分間インキュベートし、この結合アビジンは既に細胞に結合しているビオチン化抗-Tacに結合した。細胞を上記のように再び洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS中で固定し、そしてFACSCANタイプフルオロメーター上で蛍光分析した。

第一段階における融合体としての抗-Tac抗体の使用量を増加していくと(10-40ng)、第二段階において細胞に結合

することができたビオチン化抗-Tacの量を減少させ、従って最終段階において結合したフィコエリトリン結合アビジンの量を減少させ、こうして蛍光を減少させた(図10A)。当量(20ng)の抗-Tacおよび融合体として使ったヒト化抗-Tacは、蛍光をほぼ同じ程度に減少させた(図10B)。このことは、それらの抗体がほぼ同じ親和力(3-4倍以内)を有することを示す。というのは、もし一万がずっと大きな親和力を有するならば、より有効にビオチン化抗-Tacと競争し、従って蛍光をもっと減少させたであろうからである。

#### ヒト化抗体の生物学的性質

ヒトの病気の処置における最適な使用のため、ヒト化抗体はIL-2レセプターを表現している体内のT細胞を破壊することができなければならない。抗体が標的細胞を破壊し得る1つの機構は、ADCCと称される抗体依存性細胞傷害作用(Fundamental Immunology, Paul M. 編, Raven Press, New York (1934), 681頁)であり、この場合抗体は、標的細胞と標的細胞との間に架橋を形成する。ヒト化抗体と元のマウス抗-Tac抗体がADCCを媒介することができるかどうかを決定するために、腹水法によりクロム放出アッセイを行った。詳しくは、IL-2レセプターを表現するヒト白血病HUT-102細胞を $^{51}\text{Cr}$ と共にインキュベートし、それらにこの放射性標識を吸収させた。次いでHUT-102細胞を過剰量の抗-Tacまたはヒト化抗-Tac抗体のいずれか一方と共にインキュベートした。次にヒト細胞をIL-2との約20時間のインキュ

ベーションによって活性化された通常の精製ヒト末梢血単核細胞である30:1または100:1の比のエフェクター細胞と共に4時間インキュベートした。標的HUT-102細胞の溶解を示す $^{51}\text{Cr}$ の放出を測定し、そしてバックグラウンドを差し引いた(表1)。その結果は、どちらの比のエフェクター細胞においても、抗-Tacは有意な数の標的細胞を溶解しなかった(5%未満)が、一方ヒト化抗体は溶解した(20%より多く)ことを示す。従って、ヒト化抗体は、T細胞白血病または他のT細胞媒介性の病気を治療することにおいて、おそらく元のマウス抗体よりも効果的であろう。

表 1

ADCC後の $^{51}\text{Cr}$  放出率(%)

抗 体	エフェクター：標的比	
	30:1	100:1
抗-Tac	4%	<1%
ヒト化抗-Tac	24%	23%

上記から、本発明のヒト免疫グロブリンが他の抗体の多数の利点を提供することは明らかであろう。例えば、抗-Tacマウスモノクローナル抗体と比較すると、本発明のヒトIL-2レセプター免疫グロブリンは、より経済的に生産することができる、そして実質的に少ない外発アミノ酸配列を含むことができる。ヒト患者への注入後に抗原性となる可能性の減少は、上記の基礎に従って設計された免疫グロブリンによって有意な質的改善を意味する。

本発明を明確化および理解のために説明および実施例によ

り幾分詳細に記載してきたが、添付の請求の範囲内で幾つかの変更および改良を行い得ることは明らかであろう。

1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71 73 75 77 79 81 83 85 87 89 91 93 95 97 99 101 103 105 107 109 111 113 115 117 119 121 123 125 127 129 131 133 135 137 139 141 143 145 147 149 151 153 155 157 159 161 163 165 167 169 171 173 175 177 179 181 183 185 187 189 191 193 195 197 199 201 203 205 207 209 211 213 215 217 219 221 223 225 227 229 231 233 235 237 239 241 243 245 247 249 251 253 255 257 259 261 263 265 267 269 271 273 275 277 279 281 283 285 287 289 291 293 295 297 299 301 303 305 307 309 311 313 315 317 319 321 323 325 327 329 331 333 335 337 339 341 343 345 347 349 351 353 355 357 359 361 363 365 367 369 371 373 375 377 379 381 383 385 387 389 391 393 395 397 399 401 403 405 407 409 411 413 415 417 419 421 423 425 427 429 431 433 435 437 439 441 443 445 447 449 451 453 455 457 459 461 463 465 467 469 471 473 475 477 479 481 483 485 487 489 491 493 495 497 499 501 503 505 507 509 511 513 515 517 519 521 523 525 527 529 531 533 535 537 539 541 543 545 547 549 551 553 555 557 559 561 563 565 567 569 571 573 575 577 579 581 583 585 587 589 591 593 595 597 599 601 603 605 607 609 611 613 615 617 619 621 623 625 627 629 631 633 635 637 639 641 643 645 647 649 651 653 655 657 659 661 663 665 667 669 671 673 675 677 679 681 683 685 687 689 691 693 695 697 699 701 703 705 707 709 711 713 715 717 719 721 723 725 727 729 731 733 735 737 739 741 743 745 747 749 751 753 755 757 759 761 763 765 767 769 771 773 775 777 779 781 783 785 787 789 791 793 795 797 799 801 803 805 807 809 811 813 815 817 819 821 823 825 827 829 831 833 835 837 839 841 843 845 847 849 851 853 855 857 859 861 863 865 867 869 871 873 875 877 879 881 883 885 887 889 891 893 895 897 899 901 903 905 907 909 911 913 915 917 919 921 923 925 927 929 931 933 935 937 939 941 943 945 947 949 951 953 955 957 959 961 963 965 967 969 971 973 975 977 979 981 983 985 987 989 991 993 995 997 999 1001 1003 1005 1007 1009 1011 1013 1015 1017 1019 1021 1023 1025 1027 1029 1031 1033 1035 1037 1039 1041 1043 1045 1047 1049 1051 1053 1055 1057 1059 1061 1063 1065 1067 1069 1071 1073 1075 1077 1079 1081 1083 1085 1087 1089 1091 1093 1095 1097 1099 1101 1103 1105 1107 1109 1111 1113 1115 1117 1119 1121 1123 1125 1127 1129 1131 1133 1135 1137 1139 1141 1143 1145 1147 1149 1151 1153 1155 1157 1159 1161 1163 1165 1167 1169 1171 1173 1175 1177 1179 1181 1183 1185 1187 1189 1191 1193 1195 1197 1199 1201 1203 1205 1207 1209 1211 1213 1215 1217 1219 1221 1223 1225 1227 1229 1231 1233 1235 1237 1239 1241 1243 1245 1247 1249 1251 1253 1255 1257 1259 1261 1263 1265 1267 1269 1271 1273 1275 1277 1279 1281 1283 1285 1287 1289 1291 1293 1295 1297 1299 1301 1303 1305 1307 1309 1311 1313 1315 1317 1319 1321 1323 1325 1327 1329 1331 1333 1335 1337 1339 1341 1343 1345 1347 1349 1351 1353 1355 1357 1359 1361 1363 1365 1367 1369 1371 1373 1375 1377 1379 1381 1383 1385 1387 1389 1391 1393 1395 1397 1399 1401 1403 1405 1407 1409 1411 1413 1415 1417 1419 1421 1423 1425 1427 1429 1431 1433 1435 1437 1439 1441 1443 1445 1447 1449 1451 1453 1455 1457 1459 1461 1463 1465 1467 1469 1471 1473 1475 1477 1479 1481 1483 1485 1487 1489 1491 1493 1495 1497 1499 1501 1503 1505 1507 1509 1511 1513 1515 1517 1519 1521 1523 1525 1527 1529 1531 1533 1535 1537 1539 1541 1543 1545 1547 1549 1551 1553 1555 1557 1559 1561 1563 1565 1567 1569 1571 1573 1575 1577 1579 1581 1583 1585 1587 1589 1591 1593 1595 1597 1599 1601 1603 1605 1607 1609 1611 1613 1615 1617 1619 1621 1623 1625 1627 1629 1631 1633 1635 1637 1639 1641 1643 1645 1647 1649 1651 1653 1655 1657 1659 1661 1663 1665 1667 1669 1671 1673 1675 1677 1679 1681 1683 1685 1687 1689 1691 1693 1695 1697 1699 1701 1703 1705 1707 1709 1711 1713 1715 1717 1719 1721 1723 1725 1727 1729 1731 1733 1735 1737 1739 1741 1743 1745 1747 1749 1751 1753 1755 1757 1759 1761 1763 1765 1767 1769 1771 1773 1775 1777 1779 1781 1783 1785 1787 1789 1791 1793 1795 1797 1799 1801 1803 1805 1807 1809 1811 1813 1815 1817 1819 1821 1823 1825 1827 1829 1831 1833 1835 1837 1839 1841 1843 1845 1847 1849 1851 1853 1855 1857 1859 1861 1863 1865 1867 1869 1871 1873 1875 1877 1879 1881 1883 1885 1887 1889 1891 1893 1895 1897 1899 1901 1903 1905 1907 1909 1911 1913 1915 1917 1919 1921 1923 1925 1927 1929 1931 1933 1935 1937 1939 1941 1943 1945 1947 1949 1951 1953 1955 1957 1959 1961 1963 1965 1967 1969 1971 1973 1975 1977 1979 1981 1983 1985 1987 1989 1991 1993 1995 1997 1999 2001 2003 2005 2007 2009 2011 2013 2015 2017 2019 2021 2023 2025 2027 2029 2031 2033 2035 2037 2039 2041 2043 2045 2047 2049 2051 2053 2055 2057 2059 2061 2063 2065 2067 2069 2071 2073 2075 2077 2079 2081 2083 2085 2087 2089 2091 2093 2095 2097 2099 2101 2103 2105 2107 2109 2111 2113 2115 2117 2119 2121 2123 2125 2127 2129 2131 2133 2135 2137 2139 2141 2143 2145 2147 2149 2151 2153 2155 2157 2159 2161 2163 2165 2167 2169 2171 2173 2175 2177 2179 2181 2183 2185 2187 2189 2191 2193 2195 2197 2199 2201 2203 2205 2207 2209 2211 2213 2215 2217 2219 2221 2223 2225 2227 2229 2231 2233 2235 2237 2239 2241 2243 2245 2247 2249 2251 2253 2255 2257 2259 2261 2263 2265 2267 2269 2271 2273 2275 2277 2279 2281 2283 2285 2287 2289 2291 2293 2295 2297 2299 2301 2303 2305 2307 2309 2311 2313 2315 2317 2319 2321 2323 2325 2327 2329 2331 2333 2335 2337 2339 2341 2343 2345 2347 2349 2351 2353 2355 2357 2359 2361 2363 2365 2367 2369 2371 2373 2375 2377 2379 2381 2383 2385 2387 2389 2391 2393 2395 2397 2399 2401 2403 2405 2407 2409 2411 2413 2415 2417 2419 2421 2423 2425 2427 2429 2431 2433 2435 2437 2439 2441 2443 2445 2447 2449 2451 2453 2455 2457 2459 2461 2463 2465 2467 2469 2471 2473 2475 2477 2479 2481 2483 2485 2487 2489 2491 2493 2495 2497 2499 2501 2503 2505 2507 2509 2511 2513 2515 2517 2519 2521 2523 2525 2527 2529 2531 2533 2535 2537 2539 2541 2543 2545 2547 2549 2551 2553 2555 2557 2559 2561 2563 2565 2567 2569 2571 2573 2575 2577 2579 2581 2583 2585 2587 2589 2591 2593 2595 2597 2599 2601 2603 2605 2607 2609 2611 2613 2615 2617 2619 2621 2623 2625 2627 2629 2631 2633 2635 2637 2639 2641 2643 2645 2647 2649 2651 2653 2655 2657 2659 2661 2663 2665 2667 2669 2671 2673 2675 2677 2679 2681 2683 2685 2687 2689 2691 2693 2695 2697 2699 2701 2703 2705 2707 2709 2711 2713 2715 2717 2719 2721 2723 2725 2727 2729 2731 2733 2735 2737 2739 2741 2743 2745 2747 2749 2751 2753 2755 2757 2759 2761 2763 2765 2767 2769 2771 2773 2775 2777 2779 2781 2783 2785 2787 2789 2791 2793 2795 2797 2799 2801 2803 2805 2807 2809 2811 2813 2815 2817 2819 2821 2823 2825 2827 2829 2831 2833 2835 2837 2839 2841 2843 2845 2847 2849 2851 2853 2855 2857 2859 2861 2863 2865 2867 2869 2871 2873 2875 2877 2879 2881 2883 2885 2887 2889 2891 2893 2895 2897 2899 2901 2903 2905 2907 2909 2911 2913 2915 2917 2919 2921 2923 2925 2927 2929 2931 2933 2935 2937 2939 2941 2943 2945 2947 2949 2951 2953 2955 2957 2959 2961 2963 2965 2967 2969 2971 2973 2975 2977 2979 2981 2983 2985 2987 2989 2991 2993 2995 2997 2999 3001 3003 3005 3007 3009 3011 3013 3015 3017 3019 3021 3023 3025 3027 3029 3031 3033 3035 3037 3039 3041 3043 3045 3047 3049 3051 3053 3055 3057 3059 3061 3063 3065 3067 3069 3071 3073 3075 3077 3079 3081 3083 3085 3087 3089 3091 3093 3095 3097 3099 3101 3103 3105 3107 3109 3111 3113 3115 3117 3119 3121 3123 3125 3127 3129 3131 3133 3135 3137 3139 3141 3143 3145 3147 3149 3151 3153 3155 3157 3159 3161 3163 3165 3167 3169 3171 3173 3175 3177 3179 3181 3183 3185 3187 3189 3191 3193 3195 3197 3199 3201 3203 3205 3207 3209 3211 3213 3215 3217 3219 3221 3223 3225 3227 3229 3231 3233 3235 3237 3239 3241 3243 3245 3247 3249 3251 3253 3255 3257 3259 3261 3263 3265 3267 3269 3271 3273 3275 3277 3279 3281 3283 3285 3287 3289 3291 3293 3295 3297 3299 3301 3303 3305 3307 3309 3311 3313 3315 3317 3319 3321 3323 3325 3327 3329 3331 3333 3335 3337 3339 3341 3343 3345 3347 3349 3351 3353 3355 3357 3359 3361 3363 3365 3367 3369 3371 3373 3375 3377 3379 3381 3383 3385 3387 3389 3391 3393 3395 3397 3399 3401 3403 3405 3407 3409 3411 3413 3415 3417 3419 3421 3423 3425 3427 3429 3431 3433 3435 3437 3439 3441 3443 3445 3447 3449 3451 3453 3455 3457 3459 3461 3463 3465 3467 3469 3471 3473 3475 3477 3479 3481 3483 3485 3487 3489 3491 3493 3495 3497 3499 3501 3503 3505 3507 3509 3511 3513 3515 3517 3519 3521 3523 3525 3527 3529 3531 3533 3535 3537 3539 3541 3543 3545 3547 3549 3551 3553 3555 3557 3559 3561 3563 3565 3567 3569 3571 3573 3575 3577 3579 3581 3583 3585 3587 3589 3591 3593 3595 3597 3599 3601 3603 3605 3607 3609 3611 3613 3615 3617 3619 3621 3623 3625 3627 3629 3631 3633 3635 3637 3639 3641 3643 3645 3647 3649 3651 3653 3655 3657 3659 3661 3663 3665 3667 3669 3671 3673 3675 3677 3679 3681 3683 3685 3687 3689 3691 3693 3695 3697 3699 3701 3703 3705 3707 3709 3711 3713 3715 3717 3719 3721 3723 3725 3727 3729 3731 3733 3735 3737 3739 3741 3743 3745 3747 3749 3751 3753 3755 3757 3759 3761 3763 3765 3767 3769 3771 3773 3775 3777 3779 3781 3783 3785 3787 3789 3791 3793 3795 3797 3799 3801 3803 3805 3807 3809 3811 3813 3815 3817 3819 3821 3823 3825 3827 3829 3831 3833 3835 3837 3839 3841 3843 3845 3847 3849 3851 3853 3855 3857 3859 3861 3863 3865 3867 3869 3871 3873 3875 3877 3879 3881 3883 3885 3887 3889 3891 3893 3895 3897 3899 3901 3903 3905 3907 3909 3911 3913 3915 3917 3919 3921 3923 3925 3927 3929 3931 3933 3935 3937 3939 3941 3943 3945 3947 3949 3951 3953 3955 3957 3959 3961 3963 3965 3967 3969 3971 3973 3975 3977 3979 3981 3983 3985 3987 3989 3991 3993 3995 3997 3999 4001 4003 4005 4007 4009 4011 4013 4015 4017 4019 4021 4023 4025 4027 4029 4031 4033 4035 4037 4039 4041 4043 4045 4047 4049 4051 4053 4055 4057 4059 4061 4063 4065 4067 4069 4071 4073 4075 4077 4079 4081 4083 4085 4087 4089 4091 4093 4095 4097 4099 4101 4103 4105 4107 4109 4111 4113 4115 4117 4119 4121 4123 4125 4127 4129 4131 4133 4135 4137 4139 4141 4143 4145 4147 4149 4151 4153 4155 4157 4159 4161 4163 4165 4167 4169 4171 4173 4175 4177 4179 4181 4183 4185 4187 4189 4191 4193 4195 4197 4199 4201 4203 4205 4207 4209 4211 4213 4215 4217 4219 4221 4223 4225 4227 4229 4231 4233 4235 4237 4239 4241 4243 4245 4247 4249 4251 4253 4255 4257 4259 4261 4263 4265 4267 4269 4271 4273 4275 4277 4279 4281 4283 4285 4287 4289 4291 4293 4295 4297 4299 4301 4303 4305 4307 4309 4311 4313 4315 4317 4319 4321 4323 4325 4327 4329 4331 4333 4335 4337 4339 4341 4343 4345 4347 4349 4351 4353 4355 4357 4359 4361 4363 4365 4367 4369 4371 4373 4375 4377 4379 4381 4383 4385 4387 4389 4391 4393 4395 4397 4399 4401 4403 4405 4407 4409 4411 4413 4415 4417 4419 4421 4423 4425 4427 4429 4431 4433 4435 4437 4439 4441 4443 4445 4447 4449 4451 4453 4455 4457 4459 4461 4463 4465 4467 4469 4471 4473 4475 4477 4479 4481 4483 4485 4487 4489 4491 4493 4495 4497 4499 4501 4503 4505 4507 4509 4511 4513 4515 4517 4519 4521 4523 4525 4527 4529 4531 4533 4535 4537 4539 4541 4543 4545 4547 4549 4551 4553 4555 4557 4559 4561 4563 4565 4567 4569 4571 4573 4575 4577 4579 4581 4583 4585 4587 4589 4591 4593 4595 4597 4599 4601 4603 4605 4607 4609 4611 4613 4615 4617 4619 4621 4623 4625 4627 4629 4631 4633 4635 4637 4639 4641 4643 4645 4647 4649 4651 4653 4655 4657 4659 4661 4663 4665 4667 4669 4671 4673 4675 4677 4679 4681 4683 4685 4687 4689 4691 4693 4695 4697 4699 4701 4703 4705 4707 4709 4711 4713 4715 4717 4719 4721 4723 4725 4727 4729 4731 4733 4735 4737 4739 4741 4743 4745 4747 4749 4751 4753 4755 4757 4759 4761 4763 4765 4767 4769 4771 4773 4775 4777 4779 4781 4783 4785 4787 4789 4791 4793 4795 4797 4799 4801 4803 4805 4807 4809 4811 4813 4815 4817 4819 4821 4823 4825 4827 4829 4831 4833 4835 4837 4839 4841 4843 4845 4847 4849 4851 4853 4855 4857 4859 4861 4863 4865 4867 4869 4871 4873 4875 4877 4879 4881 4883 4885 4887 4889 4891 4893 4895 4897 4899 4901 4903 4905 4907 4909 4911 4913 4915 4917 4919 4921 4923 4925 4927 4929 4931 4933 4935 4937 4939 4941 4943 4945 4947 4949 4951 4953 4955 4957 4959 4961 4963 4965 4967 4969 4971 4973 4975 4977 4979 4981 4983 4985 4987 4989 4991 4993 4995 4997 4999 5001 5003 5005 5007 5009 5011 5013 5015 5017 5019 5021 5023 5025 5027 5029 5031 5033 5035 5037 5039 5041 5043 5045 5047 5049 5051 5053 5055 5057 5059 5061 5063 5065 5067 5069 5071 5073 5075 5077 5079 5081 5083 5085 5087 5089 5091 5093 5095 5097 5099 5101 5103 5105 5107 5109 5111 5113 5115 5117 5119 5121 5123 5125 5127 5129 5131 5133 5135 5137 5139 5141 5143





[illegible][illegible]

PC: 4509/2024]

4. OBSERVATIONS BEING WRITTEN UP IMMEDIATELY IS LACKING

5. WILSON 1-4, 10 AND 13, GIVE TO A COMPARISON OF THE TWO PAGES FROM THE SAME IMMEDIATELY AVAILABLE SOURCE. THE TWO PAGES ARE A SUMMARY OF TRAINING I WILL DISCOVER. THE TWO PAGES ARE A SUMMARY, DISCOVERED IN CLASS 230. THE TWO PAGES ARE A SUMMARY OF THE TWO PAGES.

41. Items 3-11 and 22. cover a .....  
 some .....  
 of 1, 17, 3 and also and contains 147.

lit. blades 46 and 47, grows to 250' covering a small streambed region and covering 60% of an immingulate streambed, associated to Class 320, sections 47.

[illegible]

U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1967 O 340-000		U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1967 O 340-000	
U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1967 O 340-000		U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1967 O 340-000	
Y	Science, Volume 129 Issued 20 September 1965 KALISH, "Translocases provide novel chromatin structures," pp. 1221-1227. See entire document.	10-77	
Y	Science, Volume 132 Issued 01 May 1966 HALLWACH "On structure, function and expression of lac- operon-2 products on normal and malignant lymphocytes," pp. 773-772. See entire document.	1-17	
Y	Journal of Immunology, Volume 124(5) Issued in April 1961 LAMM, "A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally active human T cells". See entire document.	1-17	1-17
Y	Science, Volume 139 Issued 25 March 1968 VIRSHUP ET AL. "Reaching human antibodies: grafting an antipeptide activity," pp. 1331- 1334. See entire document.	10-77	1-17
Y	Science, Volume 121 Issued 29 May 1966 JONES ET AL. "Reaching the complementation-determining regions in a human antibody with clones from a mouse," pp. 523-523. See entire document.	10-77	1-17
Y	Science, Volume 132 Issued 24 March 1966 REICHMAN ET AL. "Reaching human antibodies for therapy" pp. 313-316. See entire document.	10-77	1-17

第1頁の続き

特表平4-502408 (16)

④int. Cl. \*

識別記号

片内整理番号

A 61 K 39/395

U

8829-4C

C 07 K 15/06

7731-4H

C 12 N 5/10

15/13

/(C 12 P 21/09

C 12 R 1:91)

優先権主張

④1989年2月13日④米国(US)④310,252

④発明者

セリク, ハロルド エドウィン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002, ベルモント, サニー  
スロープ アベニュー 1673